

METHOD FOR CONTROLLING MOLECULAR WEIGHT OF POLYHYDROXYALKANOATE IN WHICH UNITS CONTAINING PHENYL, THIENYL OR CYCLOHEXYL STRUCTURE-HAVING RESIDUES IN SIDE CHAINS ARE CONTAINED, AND POLYHYDROXYALKANOATE

Publication number: JP2003319792

Publication date: 2003-11-11

Inventor: YANO TETSUYA; KENMOKU TAKASHI; HONMA TSUTOMU; SUGAWA ETSUKO; FUKUI SHIGE; IMAMURA TAKESHI

Applicant: CANON KK

Classification:

- international: C08G63/06; C08G63/688; C12P7/62; C12P11/00; C12P17/00; C12R1/38; C12R1/40; C08G63/00; C12P7/62; C12P11/00; C12P17/00; (IPC1-7); C12P7/62; C08G63/06; C12P11/00; C12P17/00; C12P7/62; C12R1/38; C12P11/00; C12R1/40; C12P17/00; C12R1/40

- European: C08G63/06; C08G63/688B; C12P7/62A

Application number: JP20030036819 20030214

Priority number(s): JP20030036819 20030214; JP20020054907 20020228

Also published as:

-  EP1340776 (A1)
-  US6649380 (B1)
-  US2003208028 (A1)
-  CN1285640C (C)

[Report a data error here](#)

Abstract of **JP2003319792**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for controlling the molecular weight of a polyhydroxyalkanoate in which units containing phenyl, thietyl or cyclohexyl structure-having residues in side chains are contained, and to provide the polyhydroxyalkanoate having a controlled molecular weight.

SOLUTION: This method for controlling the molecular weight of the polyhydroxyalkanoate is characterized by having a process for culturing a microorganism having an ability for producing the polyhydroxyalkanoate from at least one of an [omega]-substituted alkanoic acid (3) having at least one of phenyl structure and thietyl structure and an [omega]-cyclohexylalkanoic acid (4) having a cyclohexyl structure in a culture medium containing at least one of the compound (3) and the compound (4) and a hydroxyl group-having compound.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-319792

(P2003-319792A)

(43)公開日 平成15年11月11日 (2003.11.11)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 P 7/62
C 08 G 63/06
C 12 P 11/00
17/00
// (C 12 P 7/62

識別記号

F I
C 12 P 7/62
C 08 G 63/06
C 12 P 11/00
17/00
C 12 R 1:38

テ-マコ-ト^{*} (参考)
4 B 0 6 4
4 J 0 2 9

審査請求 有 請求項の数12 O.L. (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2003-36819(P2003-36819)
(22)出願日 平成15年2月14日 (2003.2.14)
(31)優先権主張番号 特願2002-54907(P2002-54907)
(32)優先日 平成14年2月28日 (2002.2.28)
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000001007
キヤノン株式会社
東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(72)発明者 矢野 桂哉
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内
(73)発明者 見目 敏
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内
(74)代理人 100123788
弁理士 宮崎 昭夫 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 側鎖にフェニル構造、チエニル構造、シクロヘキシリル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法、およびポリヒドロキシアルカノエート

(57)【要約】

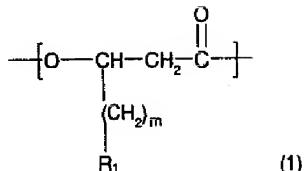
【課題】 側鎖にフェニル構造、チオフェン構造、シクロヘキシリル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法ならびに分子量が制御されたポリヒドロキシアルカノエートを提供することにある。

【解決手段】 フェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有するω-置換アルカン酸(3)、あるいは、シクロヘキシリル構造を有するω-シクロヘキシリルアルカン酸(4)、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記(3)あるいは前記(4)の少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法。

【特許請求の範囲】

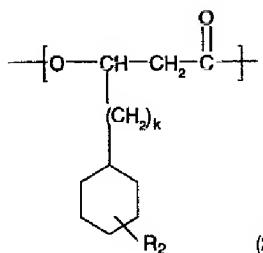
【請求項1】 下記式(1) :

【化1】



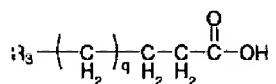
(mは1~8の整数を表し、R₁はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(2) :

【化2】



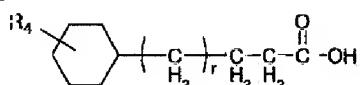
(kは0~8の整数を表し、R₂はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₂はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法において、式(3) :

【化3】



(qは1~8の整数を表し、R₃はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。)で示されるω-置換アルカン酸、あるいは、式(4) :

【化4】

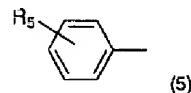


(rは0~8の整数を表し、R₄はシクロヘキシル基へ

の置換基を示し、R₄はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示されるω-シクロヘキシルアルカン酸、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記式(3)あるいは前記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法。

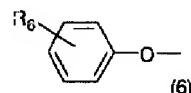
【請求項2】 前記R₁およびR₃が、式(5) :

【化5】



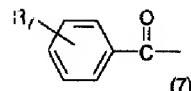
(式中、R₅は芳香環への置換基を示し、R₅はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CH=CH₂基、COOR₅₁ (R₅₁はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表し、R₁の場合のみ選択される。)、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6) :

【化6】



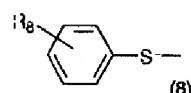
(式中、R₆は芳香環への置換基を示し、R₆はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、SCH₃基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7) :

【化7】



(式中、R₇は芳香環への置換基を示し、R₇はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8) :

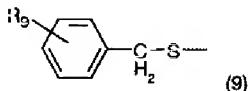
【化8】



(式中、R₈は芳香環への置換基を示し、R₈はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₈₁ (R₈₁は

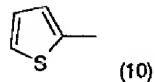
H原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す。)、SO₂R₉₂(R₉₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す。)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群；式(9)：

【化9】



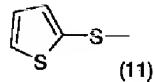
(式中、R₉は芳香環への置換基を示し、R₉はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₉₁(R₉₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₉₂(R₉₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群；式(10)：

【化10】



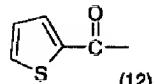
で示される2-チエニル基；式(11)：

【化11】



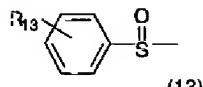
で示される2-チエニルスルファニル基；式(12)：

【化12】



で示される2-チエニカルボニル基；式(13)：

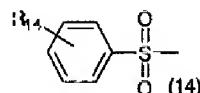
【化13】



(式中、R₁₃は芳香環への置換基を示し、R₁₃はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₁₃₁(R₁₃₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₁₃₂(R₁₃₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR₁の場合のみ選択される

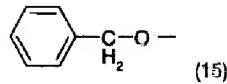
無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(14)：

【化14】



(式中、R₁₄は芳香環への置換基を示し、R₁₄はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₁₄₁(R₁₄₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₁₄₂(R₁₄₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR₁の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルホニル基群；及び、式(15)：

【化15】



で示される(フェニルメチル)オキシ基；から選択された残基である請求項1に記載の分子量制御方法。

【請求項3】 前記水酸基を有する化合物が、アルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類である請求項1または2に記載の分子量制御方法。

【請求項4】 前記アルコール類、ジオール類及びトリオール類化合物が、炭素数3から14の直鎖状及び分岐状のアルコール類、ジオール類及びトリオール類である請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項5】 前記アルキレングリコール類及びアルキレングリコールモノエステル類化合物の炭素鎖が、炭素数2から10の直鎖状及び分岐状構造を有している請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項6】 前記ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物の数平均分子量が、100から20000の範囲である請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項7】 前記水酸基を有する化合物の濃度が、微生物培養の際の培地に対して0.01%から10%(質量/容量)である請求項1から6のいずれかに記載の分子量制御方法。

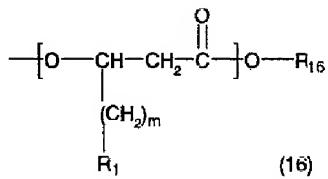
【請求項8】 前記水酸基を有する化合物の濃度が、微生物培養の際の培地に対して0.02%から5%(質量/容量)である請求項7に記載の分子量制御方法。

【請求項9】 前記微生物が、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物である請求項1から8のいずれかに記載の分子量制御方法。

【請求項10】 前記微生物が、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45, FERM BP-7374)、シュードモナス ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161, FERM BP-7376) 及びシュードモナス プチダ P91株 (*Pseudomonas putida* P91, FERM BP-7373) の1つ以上の株である請求項9に記載の分子量制御方法。

【請求項11】 下記式(16) :

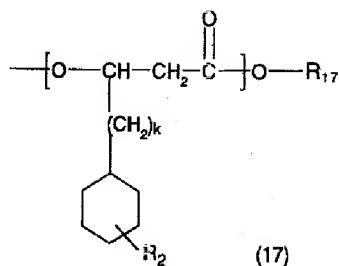
【化16】



(mは1~8の整数を表し、R₁はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものであってよい。R₁₆はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート。

ト、あるいは、式(17) :

【化17】

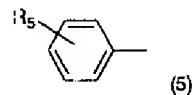


(kは0~8の整数を表し、R₂はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₂はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものであってよい。R₁₇はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート。

るものであってもよい。R₁₇はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート。

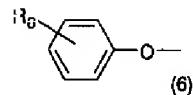
【請求項12】 前記R₁が、式(5) :

【化18】



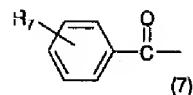
(式中、R₅は芳香環への置換基を示し、R₅はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CH=CH₂基、COOR₅₁ (R₅₁はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表す。)、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6) :

【化19】



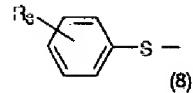
(式中、R₆は芳香環への置換基を示し、R₆はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、SCH₃基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7) :

【化20】



(式中、R₇は芳香環への置換基を示し、R₇はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8) :

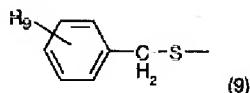
【化21】



(式中、R₈は芳香環への置換基を示し、R₈はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₈₁ (R₈₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す。)、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換スルホニル基群；式(9) :

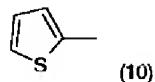
れかを表す。)、 SO_2R_{92} (R_{92} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 のいずれかを表す。)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_2-\text{CH}$ 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_3-\text{C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群；式(9)：

【化22】



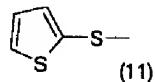
(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{91} (R_{91} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 SO_2R_{92} (R_{92} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_2-\text{CH}$ 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_3-\text{C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群；式(10)：

【化23】



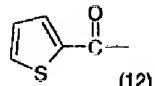
で示される2-チエニル基；式(11)：

【化24】



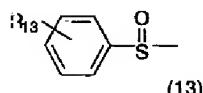
で示される2-チエニルスルファニル基；式(12)：

【化25】



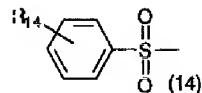
で示される2-チエニルカルボニル基；式(13)：

【化26】



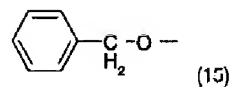
(式中、 R_{13} は芳香環への置換基を示し、 R_{13} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{131} (R_{131} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{132}$ (R_{132} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_2-\text{CH}$ 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_3-\text{C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(14)：

【化27】



(式中、 R_{14} は芳香環への置換基を示し、 R_{14} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{141} (R_{141} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{142}$ (R_{142} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_2-\text{CH}$ 基、 $(\text{C}_3\text{H}_7)_3-\text{C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基群；及び、式(15)：

【化28】



で示される(フェニルメチル)オキシ基；から選択された残基である請求項11に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はポリエステルの一種であるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)の分子量制御方法に関する。更に詳しくは、当該PHAを生産し体内に蓄積する微生物を用いた当該PHAの分子量制御方法に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告してきた(「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、(株)エヌ・ティー・エス、P178-197(1995))(非特許文献1)。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利点を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こさがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】微生物産生PHAはその生合成機構から大きく2種類に分類することができる。一方は、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリヒドロキシ吉草酸(PH)

V)、或いはこれらの共重合体に代表される短鎖長PHA (short-chain-length PHA; 以降sc1-PHAと記す) であり、他方は炭素鎖長が6から14程度までの中鎖長3-ヒドロキシアルカン酸をユニットとする中鎖長PHA (medium-chain-length PHA; 以降mc1-PHAと記す) である。

【0005】前者、即ちsc1-PHAは、グルコースやグルコン酸といった糖類や、乳酸、ビルビン酸、リノゴ酸といった有機酸類が生体内で代謝された産物であるアセチルCoAを出発物質とし、酵素的に二量体化、還元作用を受けてポリマー化される。

【0006】後者、即ちmc1-PHAは、アルカン酸を出発物質とし、脂肪酸分解系である β 酸化経路により酵素的にCoA付加、脱水素化、水付加反応を経てポリマー化される。

【0007】この様に両者は全く異なる生合成経路を経て合成され、実際生体内の酵素群も異なっていることが詳細な研究により明らかとなっている。

【0008】また、後者、即ちmc1-PHAを生産する微生物のうち、ある種の微生物は様々な官能基、残基を含むPHAを生産することが知られている。

【0009】その中でも、近年ユニット中に芳香環を有するPHAの研究が盛んになされている。例えば、Macromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990) (非特許文献2) 及びMacromolecules, 24, 5256-5260 (1991) (非特許文献3) には、5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。また、Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996) (非特許文献4) には、5-(4'-トリル)吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-(4'-トリル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0010】更に、Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999) (非特許文献5) には、5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。また、Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994) (非特許文献6) には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

domonas oleovorans) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0011】一方、特許第2989175号明細書(特許文献1)には、3-ヒドロキシ-5-(モノフルオロフェノキシ)ペントノエート (3H5 (MFP) P) ユニットあるいは3-ヒドロキシ-5-(ジフルオロフェノキシ)ペントノエート (3H5 (DFP) P) ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5 (MFP) Pユニットあるいは3H5 (DFP) Pユニットを含有するコポリマー;これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ; シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撓水性を与えることができるとしている。

【0012】この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。例えば、Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995) (非特許文献7) 及びPolymer International, 39, 205-213 (1996) (非特許文献8) には、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC29347株及びシュードモナスプチダ (*Pseudomonas putida*) KT2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーアニットとして含むPHAの生産が報告されている。

【0013】また、新たなカテゴリーとしては、Macromolecules, 32, 8315-8318 (1999) (非特許文献9) 及びPolymer Preprints, Japan, 49(5), 1034 (2000) (非特許文献10) には、シュードモナスプチダ (*Pseudomonas putida*) 27N01株が11-チオフェノキシ吉草酸を基質とし、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-チオフェノキシヘプタン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0014】この様なPHAの実用に際し、その応用範囲を拡げる意味からその分子量の制御が試みられている。

【0015】米国特許6,156,852号(特許文献2)には、Ralstonia eutropha, Ralstonia latus及びComamonas

testosteroniを生産菌株として用い、PHBを生合成する際の培養培地中にエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、プロピレングリコール、ブタンジオールやヘキサンジオール、オクタンジオールといったジオール類、ブタントリオール、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ハイドロキノン、ベンゼンジメタノール、ペニタエリスリトール及びその誘導体、ソルビトールやマンニトールといった糖アルコール類を加えることによって数平均分子量を低下せしめることができることが開示されている。これらの内容は、化学論文として Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999) (非特許文献11), 及び International Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999) (非特許文献12) に詳細に報告されている。

【0016】

【特許文献1】特許第2989175号明細書

【特許文献2】米国特許6, 156, 852

【特許文献3】特開2001-288256号公報

【0017】

【非特許文献1】「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、(株)エヌ・ティ・イー・エス、P178-197 (1995)

【非特許文献2】Makromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990)

【非特許文献3】Macromolecules, 24, 5256-5260 (1991)

【非特許文献4】Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996)

【非特許文献5】Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999)

【非特許文献6】Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994)

【非特許文献7】Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995)

【非特許文献8】Polymer International, 39, 205-213 (1996)

【非特許文献9】Macromolecules, 32, 8315-8318 (1999)

【非特許文献10】Polymer Preprint s, Japan, 49 (5), 1034 (2000)

【非特許文献11】Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999)

【非特許文献12】International Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999)

【非特許文献13】FEMS Microbiolog

y Reviews, 103, 217-230 (1992)

【非特許文献14】Journal of Biotechnology, 65, 127-161 (1998)

【0018】

【発明が解決しようとする課題】この様な分子量制御技術は、酸やアルカリといった化学物質を用いることなく、PHAの生合成プロセスで行う事ができるというメリットを有しており、先に示したように、フェニル基等の官能基を有するPHAに関しても、その実用用途の範囲を拡げる意味から分子量の制御技術が要求されているが、そのような技術はこれまで開発されて来なかつた。

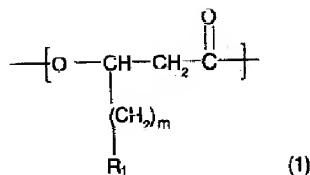
【0019】本発明の目的は、側鎖にフェニル構造、チオフェン構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法を提供することにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、以下のような発明に至った。即ち、本発明は、下記式(1)：

【0021】

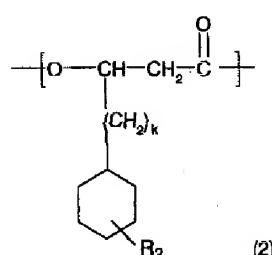
【化29】



【0022】(mは1~8の整数を表し、R₁はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(2)：

【0023】

【化30】

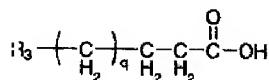


【0024】(kは0~8の整数を表し、R₂はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₂はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場

合、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法において、式(3)：

【0025】

【化31】

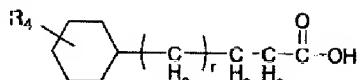


(3)

【0026】(qは1~8の整数を表し、R₃はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。)で示される ω -置換アルカン酸、あるいは、式(4)：

【0027】

【化32】



(4)

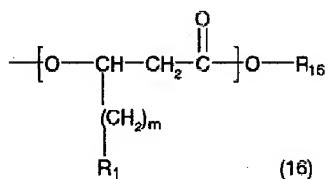
【0028】(rは0~8の整数を表し、R₄はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₄はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される ω -シクロヘキシルアルカン酸、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記式(3)あるいは前記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法である。

【0029】本発明は、水酸基を有する化合物を分子量制御剤として用いることで、微生物によるポリマー生成における分子量制御が可能である点に基づくもので、上記の構成により効果的な分子量制御を行うことを可能とするものである。

【0030】また、本発明は、下記式(16)：

【0031】

【化33】



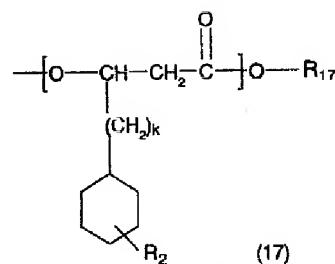
(16)

【0032】(mは1~8の整数を表し、R₁はフェニ

ル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R₁₆はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ- ω -置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(17)：

【0033】

【化34】



(17)

【0034】(kは0~8の整数を表し、R₂はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₂はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R₁₇はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートである。

【0035】

【発明の実施の形態】上記式(2)におけるR₂、及び式(4)におけるR₄は、シクロヘキシル基への置換基を示すものであり、そのシクロヘキシル基への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

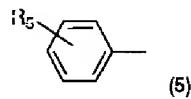
【0036】上記式(1)あるいは(2)で示される少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートは、式(1)で示されるユニットのみ有する、式(2)で示されるユニットのみ有する、式(1)で示されるユニットと式(2)で示されるユニットの両方を有する、のいずれでもよい。また、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(1)で示される2

以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのm及びR₁が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。式(1)におけるm及びR₁の少なくとも一方を異ならせる場合には、式(3)で示されるモノマーとして、所望のユニット組成が生成されるポリヒドロキシアルカノエートに得られるようにrまたはR₃の異なる少なくとも2種以上を用いる。同様に、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(2)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのk及びR₂が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。式(2)におけるk及びR₂の少なくとも一方を異ならせる場合には、式(4)で示されるモノマーとして、所望のユニット組成が生成されるポリヒドロキシアルカノエートに得られるようにrまたはR₄の異なる少なくとも2種以上を用いる。

【0037】ここで、式(1)におけるR₁、及び式(3)におけるR₃、即ちフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基としては、下記式(5)～(15)で表される残基または残基群に含まれるもののが好ましい具体例として挙げることができ、これらの少なくとも1種を式(1)におけるR₁、及び式(3)におけるR₃として用いることができる。式(5)：

【0038】

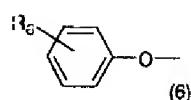
【化35】



【0039】(式中、R₅は芳香環への置換基を示し、R₅はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CH=CH₂基、COOR₅₁(R₅₁はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表し、R₁の場合のみ選択される。)、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6)：

【0040】

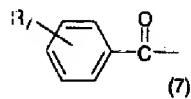
【化36】



【0041】(式中、R₆は芳香環への置換基を示し、R₆はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、SCH₃基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7)：

【0042】

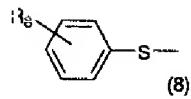
【化37】



【0043】(式中、R₇は芳香環への置換基を示し、R₇はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基、C₃F₇基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8)：

【0044】

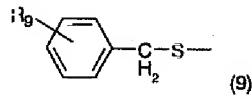
【化38】



【0045】(式中、R₈は芳香環への置換基を示し、R₈はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COO R₈₁(R₈₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す。)、SO₂R₈₂(R₈₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅基のいずれかを表す。)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群；式(9)：

【0046】

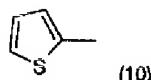
【化39】



【0047】(式中、R₉は芳香環への置換基を示し、R₉はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COO R₉₁(R₉₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₉₂(R₉₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅基のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群；式(10)：

【0048】

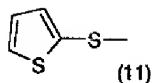
【化40】



【0049】で示される2-チエニル基；式(11)：

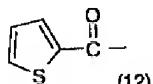
【0050】

【化41】



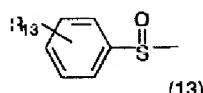
【0051】で示される2-チエニルスルファニル基；式(12)：

【0052】
【化42】



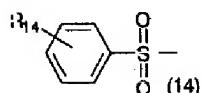
【0053】で示される2-チエニルカルボニル基；式(13)：

【0054】
【化43】



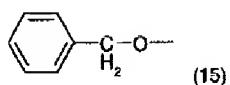
【0055】(式中、R₁₃は芳香環への置換基を示し、R₁₃はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CO OR₁₃₁(R₁₃₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₁₃₂(R₁₃₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR₁の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(14)：

【0056】
【化44】



【0057】(式中、R₁₄は芳香環への置換基を示し、R₁₄はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CO OR₁₄₁(R₁₄₁はH原子、Na原子、K原子、CH₃基、C₂H₅基のいずれかを表す)、SO₂R₁₄₂(R₁₄₂はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH₃基、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基、(CH₃)₃-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR₁の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルホニル基群；及び、式(15)：

【0058】
【化45】



【0059】で示される(フェニルメチル)オキシ基。

【0060】なお、上記式(5)におけるR₅、上記式(6)におけるR₆、上記式(7)におけるR₇、上記式(8)におけるR₈、上記式(9)におけるR₉、上記式(13)におけるR₁₃、及び上記式(14)におけるR₁₄は、芳香環への置換基を示すものであり、その芳香環への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0061】また、上記式(5)のR₅としてCOOR₅₁(R₅₁はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表す。)が選択された置換フェニル基、式(13)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基、式(14)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基は、これらの残基に変換可能な残基を含むPHAを合成後に、適切な変換によって合成するのが好ましい。

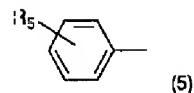
【0062】また、上記式(17)におけるR₂は、シクロヘキシル基への置換基を示すものであり、そのシクロヘキシル基への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0063】上記式(16)あるいは(17)で示される少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートは、式(16)で示されるユニットのみ有する、式(17)で示されるユニットのみ有する、式(16)で示されるユニットと式(17)で示されるユニットの両方を有する、のいずれでもよい。また、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(16)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのm及びR₁が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でm及びR₁の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。同様に、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(17)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのk及びR₂が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でk及びR₂の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。

【0064】式(16)におけるR₁、即ちフェニル構造、チエニル構造の少なくも1種を有する残基としては、下記式(5)～(15)で表される残基または残基群に含まれるものをおまじない具体例として挙げることができ、これらの少なくとも1種を式(16)におけるR₁として用いることができる。式(5)：

【0065】

【化46】

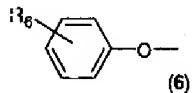


【0066】(式中、R₅は芳香環への置換基を示し、R₅はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CH=CH₂基、COOR₅₁(R₅₁はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表

す。)、 C_2F_5 基、 C_2F_6 基、 C_3F_7 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6)：

【0067】

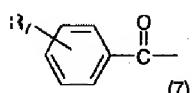
【化47】



【0068】(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基、 C_3F_7 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7)：

【0069】

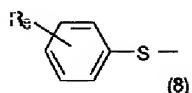
【化48】



【0070】(式中、 R_7 は芳香環への置換基を示し、 R_7 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基、 C_3F_7 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8)：

【0071】

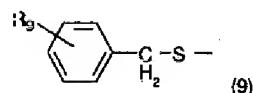
【化49】



【0072】(式中、 R_8 は芳香環への置換基を示し、 R_8 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{81}$ (R_{81} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す。)、 SO_2R_{82} (R_{82} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 基のいずれかを表す。)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群；式(9)：

【0073】

【化50】

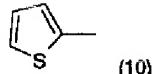


【0074】(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{91}$ (R_{91} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 SO_2R_{92} (R_{92} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 基のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(10)：

H_5 基のいずれかを表す)、 SO_2R_{92} (R_{92} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 基のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群；式(10)：

【0075】

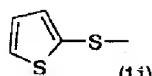
【化51】



【0076】で示される2-チエニル基；式(11)：

【0077】

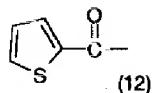
【化52】



【0078】で示される2-チエニルスルファニル基；式(12)：

【0079】

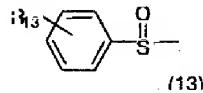
【化53】



【0080】で示される2-チエニルカルボニル基；式(13)：

【0081】

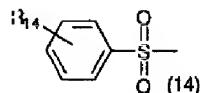
【化54】



【0082】(式中、 R_{13} は芳香環への置換基を示し、 R_{13} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{131}$ (R_{131} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 SO_2R_{132} (R_{132} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 基のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(14)：

【0083】

【化55】

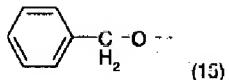


【0084】(式中、 R_{14} は芳香環への置換基を示し、 R_{14} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{141}$ (R_{141} はH原子、Na原子、K原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 SO_2R_{142} (R_{142} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 基のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基群；式(15)：

C_2H_5 基、 C_2H_5 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{142}$ (R_{142} はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 OCH_3 基、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2-\text{CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3-\text{C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基群; 及び、式(15):

【0085】

【化56】



【0086】で示される(フェニルメチル)オキシ基。
【0087】なお、上記式(5)における R_5 、上記式(6)における R_6 、上記式(7)における R_7 、上記式(8)における R_8 、上記式(9)における R_9 、上記式(13)における R_{13} 、及び上記式(14)における R_{14} は、芳香環への置換基を示すものであり、その芳香環への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0088】本発明における水酸基を有する化合物としては、アルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類を用いることができる。これらを分子量制御剤として用いることで、微生物によるポリマー生成における効果的な分子量制御を行うことを可能となる。

【0089】上記アルコール類、ジオール類及びトリオール類化合物としては、炭素数3から14の直鎖状及び分岐状のものが好ましい。

【0090】上記アルキレングリコール類及びアルキレングリコールモノエステル類化合物としては、その炭素鎖が、炭素数2から10の直鎖状及び分岐状構造を有しているものが好ましい。

【0091】上記ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物の数平均分子量は100から20000の範囲であることが好ましい。

【0092】PHAのより低分子側での制御の際に用いる分子量制御剤の分子量としては100から500程度のものがよいが、PHA生産微生物にとって増殖やPHA生産に対し阻害効果を有する場合、或いはPHA生産微生物により代謝され所望のPHA分子量制御効果を発揮し得ない場合があるので注意が必要である。

【0093】この場合特に効果の高い化合物を挙げれば、ポリエチレングリコール200(PEG200)、

ブタノール、1,2-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサンジオール、1,2,3-ブタントリオール、エチレングリコール、エチレングリコールモノメチルエーテルを挙げることができる。

【0094】また、より高分子側でのPHA分子量制御の際に用いる分子量制御剤の分子量は500から2000程度のものが好ましく、具体的には平均分子量が600から2000の範囲のポリエチレングリコール(PEG600からPEG2000)を挙げができる。

【0095】前記分子量制御剤によるPHAの分子量制御機構は以下の通りである。即ち、通常のPHA生産に於いては、モノマーユニット前駆体である3-ヒドロキシアシルCoAが、PHA合成酵素であるPHASインターベの触媒活性部位システインのチオール基とチオエステル結合により共有結合を形成し(酵素-3-ヒドロキシアシルチオエステル)、更に近傍の一分子のチオール基とチオエステル結合により共有結合を形成した3-ヒドロキシアシルCoA(酵素-3-ヒドロキシアシルチオエステル)の水酸基と、チオエステル部分が反応することによりエステル結合が生じPHAの伸長反応が進み、この反応が繰り返されることにより結果としてポリマーが合成される。この様な系に水酸基を有する遊離の前記分子量制御剤が存在した場合には、前記分子量制御剤の水酸基と酵素-3-ヒドロキシアシルチオエステルのチオエステル部分が反応してエステル結合を生じた時点で酵素から遊離することになり、結果としてその時点でPHAの伸長反応は停止することになる。

【0096】この様な、水酸基を有する化合物の濃度は、微生物培養の際の培地に対して0.01%から10%(質量/容量)、更に好ましくは0.02%から5%(質量/容量)を添加することがよく、添加次期は培養初期に一括して添加する方法、培養期間内に数回に分けて培地中に添加する方法のいずれでも良い。

【0097】本発明における微生物は、上に述べたように、上記式(3)あるいは上記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物である。

【0098】上記微生物を用いることは本発明にとって非常な構成要件である。つまり、先に「従来の技術」の項で述べた、米国特許6,156,852(特許文献2)、Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113(1999)(非特許文献11), 及びInternational Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53(1999)(非特許文献12)に開示された技術で用いる微生物は、この様な性質、即ち、式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有さないからである。

【0099】これらの特許公報及び化学文献に示される微生物は、通常ポリ 3-ヒドロキシ酪酸（以下PHBと記す）、ポリ 3-ヒドロキシ吉草酸（以下PHVと記す）のホモポリマー或いはこれらのコポリマーを生産することが報告されているが、PHBに代表される生合成経路は

- ① アセチルCoA→アセトアセチルCoA
- ② アセトアセチルCoA→3-ヒドロキシブチリルCoA
- ③ 3-ヒドロキシブチリルCoA→ポリ 3-ヒドロキシ酪酸

で示される。

【0100】一方本発明の方法に用いる微生物は、式（3）あるいは式（4）で示される少なくとも1種類の化合物が「 β 酸化経路」と呼ばれる脂肪酸分解経路に導入され、以下のような変換を受けてポリヒドロキシアルカノエートを生合成する。即ち、

- <1> 式（3）あるいは式（4）で示される少なくとも1種類の化合物→アシルCoA
- <2> アシルCoA→エノイルCoA
- <3> エノイルCoA→3-ヒドロキシアシルCoA
- <4> 3-ヒドロキシアシルCoA→ポリヒドロキシアルカノエート

に示す経路によりポリマーが生合成される。かかる生合成経路に対して本発明の分子量制御剤を用いる方法が適用できる。

【0101】更にはポリヒドロキシアルカノエートの合成を直接司る酵素は、上記③の工程で用いられるものはPHBシンターゼ或いはshort-chain-1 elongating PHAシンターゼであるのに対し、本発明の<4>工程で用いられるものはPHAシンターゼ或いはmedium-chain-length PHAシンターゼであり、基質特異性が異なった別種の酵素であることが知られている。これらのこととは、FEMS Microbiology Reviews, 103, 217-230 (1992) (非特許文献13) やJournal of Biotechnology, 65, 127-161 (1998) (非特許文献14) 等の総説論文に詳しく記載されている。

【0102】つまり、先の「従来の技術」の項における米国特許6,156,852 (特許文献2)、Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999) (非特許文献11)，及びInternational Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999) (非特許文献12) に開示された技術中で用いられる微生物と、本発明の方法で使用する微生物とは全く異なっている。この様な、本発明の方法で使用する微生物としては、式（3）あるいは式（4）で示される少なくとも1

種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物であれば如何なる微生物であっても良いが、その中でも特にシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が望ましく、更に詳しくはシュードモナス チコリアイ (*Pseudomonascichorii*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonasoleovorans*)、シュードモナス アルギノーサ (*Pseudomonasaeruginosa*)、シュードモナス スツッタリ (*Pseudomonassutzeri*)、シュードモナス ジェッセニイ (*Pseudomonas jessenii*) 等が望ましい。更に詳しくは、さらに詳しくは、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonascichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonascichorii* H45, FERM BP-7374)、シュードモナス ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161, FERM BP-7376)、シュードモナス プチダ P91株 (*Pseudomonas putida* P91, FERM BP-7373) が挙げられる。これら4種の微生物は独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、特開2001-288256号公報 (特許文献3) に記載されている微生物である。なお、微生物は2種以上を混合して用いることができる。

【0103】本発明の方法における微生物の培養条件は、以下のとおりである。リン酸緩衝液及びアンモニウム塩或いは硝酸塩を基本とした無機塩培地に、以下に示すように種々の必要基質及び栄養素等を加える。まず、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを生産するための基質として、上記式（3）あるいは式（4）で示される少なくとも1種類の化合物を培地あたり0.01%から1% (質量/容量)、更に好ましくは0.02%から0.2% (質量/容量) の割合で含有していることが望ましい。

【0104】微生物増殖のための炭素源及び窒素源、ポリヒドロキシアルカノエート生産のためのエネルギー供給源として、以下の共存基質を、通常培地あたり0.1%から5% (質量/容量)、更に好ましくは0.2%から2% (質量/容量) の割合で含有していることが望ましい。

共存基質：

- ・天然培地成分：酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、カゼミノ酸、カゼイン加水分解物、ポリペプトン、トリプトン、ペプトン等。
- ・糖類：グリセロアルデヒド、エリスロース、アラビノ

ース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、グリセロール、エリスリトール、キシリトール等のアルジトール、グルコン酸等のアルドン酸、グルクロン酸、ガラクトロン酸等のウロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等。

・有機酸或いはその塩：ビルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、オキサロ酢酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸或いはその塩等。

・アミノ酸：グルタミン酸、アスパラギン酸或いはその塩等。

・アルカン酸：炭素数4から12の直鎖或いは分岐アルカン酸等。

【0105】本発明で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩或いは硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも良いが、窒素源の濃度を調節することでPHAの生産性を向上せしめることが可能である。

【0106】培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、15℃から37℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適當である。

【0107】培養は、液体培養、固体培養等、該微生物が増殖し、PHAを生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーメンターによる攪拌通気式の酸素供給方法がある。

【0108】微生物にPHAを生産・蓄積せしめる方法としては、上に示した方法の他に、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。

【0109】本発明において、上記のように培養された微生物細胞から目的のPHAを分離する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、或いは超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩碎法、擂潰法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破碎することによって、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

【0110】なお、本発明の微生物の培養、本発明の微

生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【0111】

【実施例】実施例で用いた無機塩培地（M9培地）の組成を以下に示す。

（M9培地組成：単位g/L）

Na_2HPO_4 : 6. 3

KH_2PO_4 : 3. 0

NH_4Cl : 1. 0

NaCl : 0. 5

(pH=7. 0)

更に、良好な増殖及びPHAの生産のために、上記の無機塩培地に培地に以下に示す微量成分溶液を0. 3%（容量/容量）程度添加した。

（微量成分溶液組成：単位g/L）

ニトリロ三酢酸 : 1. 5 ; MgSO_4 : 3. 0 ; MnSO_4 : 0. 5 ; NaCl : 1. 0 ; FeSO_4 : 0. 1 ; CaCl_2 : 0. 1 ; CoCl_2 : 0. 1 ; ZnSO_4 : 0. 1 ; CuSO_4 : 0. 1 ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0. 1 ; H_3BO_3 : 0. 1 ; Na_2MoO_4 : 0. 1 ; NiCl_2 : 0. 1

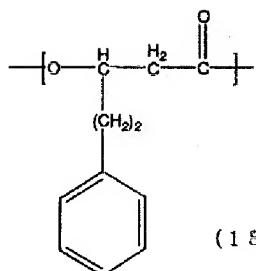
（実施例1）ポリ3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸（PHPV）のポリエチレングリコールによる分子量制御-1

ポリペプトン（和光純薬）0. 5%（質量/容量(w/v)）、5-フェニル吉草酸0. 1%（w/v）及び分子量制御剤としてポリエチレングリコール200（PEG200：平均分子量190-210；キシダ化学）を0%、1%、2%、5%（容量/容量(v/v)）含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0. 5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュードモノスチコリアイYN2株の培養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、24時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を収穫し、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、50℃で24時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバボレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。

【0112】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMR(FT-NMR: Bruker DPX400; ¹H共鳴周波数: 400MHz; 測定核種: ¹H; 使用溶媒: CDCl₃; reference: キャピラリ封入TMS/CDCl₃; 測定温度: 室温)によって行ったところ、ほぼポリ3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸（以下PHPVと記す）のホモポリマーであった（以下の式（18））。

【0113】

【化57】



【0114】これらポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により測定した（東ソー HLC-8220 GPC、カラム：東ソー TSK-GEL SuperHM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表1に示す。

【0115】

【表1】

PEG200(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1238	603	49.7	92000	1.9
1	1022	523	51.1	26000	2.0
2	1007	513	50.9	18000	2.1
5	625	343	54.8	15000	2.1

【0116】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例2) PHPVのポリエチレングリコールによる分子量制御-2
分子量制御剤としてPEG200の替わりにPEG600(平均分子量：570-630)にした以外は実施例

1と同様の方法で実験を行った。¹H-NMRにより解析した、得られたポリマーの構造は実施例1と同じくほぼPHPVホモポリマーであった。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表2に示す。

【0117】

【表2】

PEG600(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1205	600	49.8	92000	1.9
1	1100	533	48.5	70000	1.9
2	1090	533	48.9	55000	2.1
5	605	321	53.1	49000	2.0

【0118】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例3) PHPVのポリエチレングリコールによる分子量制御-3
分子量制御剤としてPEG200の替わりにPEG200(平均分子量：1800-2200)にした以外は

実施例1と同様の方法で実験を行った。¹H-NMRにより解析した、得られたポリマーの構造は実施例1と同じくほぼPHPVホモポリマーであった。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表3に示す。

【0119】

【表3】

PEG2000(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1225	602	49.1	92000	1.9
1	1090	519	47.6	80000	2.1
2	1070	522	48.8	67000	2.0
5	618	320	51.8	61000	1.9

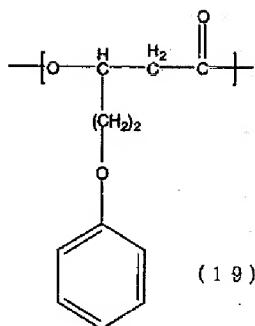
【0120】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例4) ポリ3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のポリエチレングリコールによる分子量制御
ポリペプトン0.5% (w/v)、5-フェノキシ吉草酸0.1% (w/v) を含み、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1% (v/v) 含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地200mLに、30°C、8時間振とう培養したシュードモナスチコリアイYN2株、シュードモナスチダP161株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とう

フラスコで30°C、45時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0121】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、何れもほぼポリ3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(19))。

【0122】

【化58】



【0123】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表4に示す。

【0124】

【表4】

菌株	PEG200(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
YN2	含まない	760	360	47.4	225000	2.1
	含む	750	175	23.3	92000	2.0
P161	含まない	680	150	22.1	160000	1.9
	含む	530	40	7.5	40000	2.0

【0125】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

(実施例5) PHPVの各種分子量制御剤による分子量制御

ポリペプトン0.5% (w/v)、5-フェニル吉草酸0.1% (w/v) 及び分子量制御剤を含まない、或いは分子量制御剤としてPEG200、イソプロパノール(キシダ化学)、n-ブタノール(キシダ化学)を各0.1% (v/v) 含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシードモナス チコリアイ YN2株の培

養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、40時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0126】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、何れもほぼPHPVのホモポリマーであった。

【0127】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表5に示す。

【0128】

【表5】

分子量制御剤	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
無添加	1170	705	60.3	94000	1.9
PEG200	1100	540	49.1	65000	2.1
IPA	1210	600	49.6	79000	1.9
BA	1470	635	43.2	36000	2.3

【0129】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；IPA：イソプロパノール；BA：n-ブタノール

(実施例6) ポリ3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸の各種分子量制御剤による分子量制御

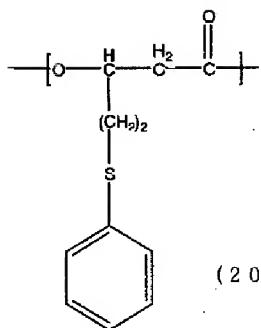
ポリペプトン0.5%及び5-(フェニルスルファニル)吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤を含まない、或いは分子量制御剤として1,2-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサンジオール、1,2,3-ブタントリオール、エチレングリコール、エチレングリコールモノメチルエーテル各0.1% (v/v) を含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシードモナス チコリアイ YN2株の培養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時

間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0130】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、何れもほぼポリ3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(20))。

【0131】

【化59】



【0132】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表6に示す。

【0133】

【表6】

分子量制御剤	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
無添加	1210	590	48.8	150000	2.3
1,2-BD	1200	570	47.5	42000	2.2
1,3-BD	1215	565	46.5	44000	2.1
1,6-HD	1150	575	50.0	29000	2.1
1,2,3-BT	1080	505	46.3	45000	2.3
EG	1230	600	48.8	50000	2.2
MEG	1200	590	49.2	53000	2.2

【0134】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；1,2-BD：1,2-ブタンジオール；1,4-BD：1,4-ブタンジオール；1,6-HD：1,6-ヘキサンジオール、1,2,3-BT：1,2,3-ブタントリオール；EG：エチレングリコール；MEG：エチレングリコールモノメチルエーテル

(実施例7) ポリ3-ヒドロキシ-5-(2-チエニル)吉草酸のPEGによる分子量制御
酵母エキス(Difco)0.5%、5-(2-チエニル)吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地200mLに、予め酵母エキス0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシードモナスアチャダP91株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、45時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0135】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMR

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	600	15	2.5	72000	3.2
含む	540	16	3.0	30000	2.8

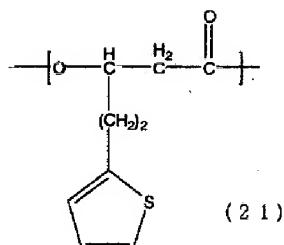
【0139】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

(実施例8) ポリ3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸のPEGによる分子量制御
D-グルコース(キシダ化学)0.5%、5-(4-フルオロフェニル)吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%

MRによって行ったところ、ほぼポリ3-ヒドロキシ-5-(2-チエニル)吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(21))。

【0136】

【化60】



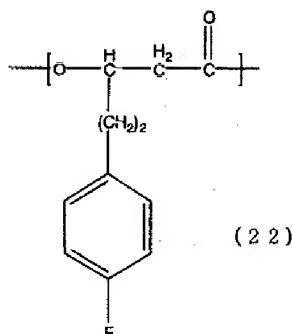
【0137】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表7に示す。

【0138】

【表7】

を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシードモナスアチャダYN2株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0140】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、ほぼポリ3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(22))。

【0141】
【化61】

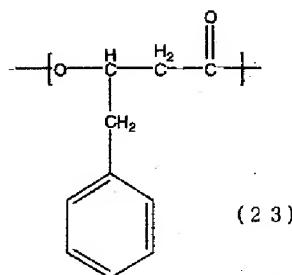
【0142】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表8に示す。

【0143】

【表8】

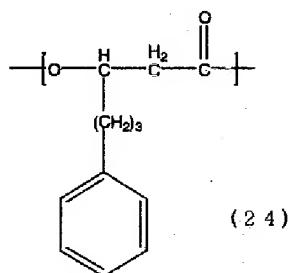
PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	790	430	54.4	90000	2.1
含む	700	390	55.7	22000	2.0

【0144】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例9) ポリ3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸、及びポリ3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸のPEGによる分子量制御
ポリマー合成基質を4-フェニル酪酸及び6-フェニルヘキサン酸に変更した以外は実施例8と同様の方法でPEG200の分子量制御効果を評価した。得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、それぞれほぼポリ3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(以下の式(23))及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(以下の式(24))のホモポリマーであった。

【0145】
【化62】

【0146】

【化63】



【0147】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表9に示す。

【0148】

【表9】

ポリマー	PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
PHPB	含まない	420	66	15.7	78000	2.2
	含む	420	69	16.4	19000	2.1
PHPHx	含まない	700	72	10.3	80000	2.3
	含む	660	69	10.5	23000	2.1

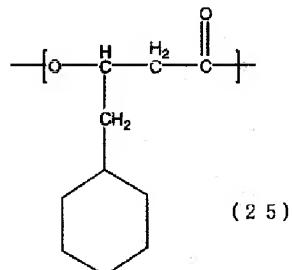
【0149】PHPB：ポリ3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸；PHPHx：3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸；CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重

量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例10) ポリ3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のPEGによる分子量制御
増殖基質をD-グルコースからポリペプトンに変更し、

ポリマー生合成基質を4-シクロヘキシル酪酸に変更して、実施例8と同様に評価した。得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、ほぼポリ3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のホモポリマーであった（以下の式（25））。

【0150】

【化64】



P:G200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	820	480	58.5	71000	2.2
含む	820	430	52.4	18000	2.1

【0153】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
 （実施例11）3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御
 ポリペプトン0.5%及び5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸、5-フェノキシ吉草酸をそれぞれ0.05%含み、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシードモナスチコリアイYN2株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で精製を行い、更にアセトン可溶成分のみを回収することで目的とするポリマーを得た。

【0154】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式（26）の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D=2:25:5:68(PEGを含まない系)及び3:24:7:6

【0151】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表10に示す。

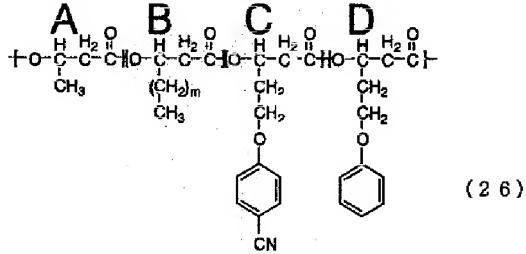
【0152】

【表10】

6(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0155】

【化65】



【0156】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表11に示す。

【0157】

【表11】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	680	110	16.2	72000	2.3
含む	660	100	15.2	20000	2.1

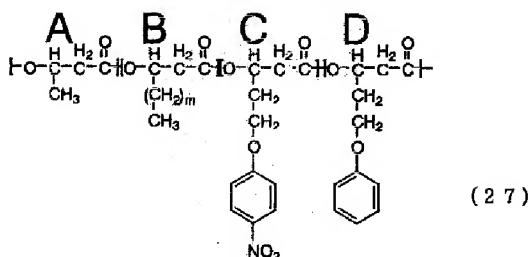
【0158】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
 （実施例12）3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ニトロフェノキシ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御
 ポリマー生産基質のうち5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸を5-(4-ニトロフェノキシ)吉草酸変更した

以外は実施例1と同様の方法でポリマーを得、PEGによる分子量制御効果を評価した。

【0159】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式（27）の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D=2:22:4:72(PEGを含まない系)及び4:23:5:68(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ニト

ロフェノキシ) 吉草酸ユニットを含む PHA であること
が示された。

【0160】
【化66】



【0161】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマ

ーの分子量及び分子量分布を表12に示す。

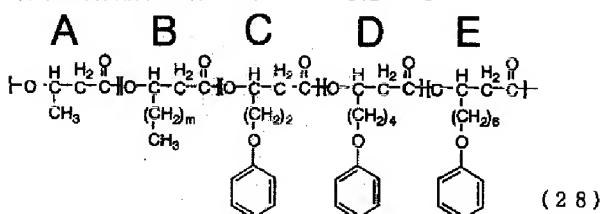
【0162】
【表12】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	590	95	16.1	70000	2.2
含む	570	80	14.0	17000	2.1

【0163】CDW：菌体乾燥重量； PDW：ポリマー乾燥重量； P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量； Mn：数平均分子量； Mw/Mn：分子量分布
(実施例13) 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御
ポリマー合成基質として11-フェノキシウンデカン酸を用い、生産菌株としてシュードモナス チコリアイ H45株を用いた以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0164】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(28)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D:E=3:1:34:51:11(PEGを含まない系)及び3:1:35:52:9(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0165】
【化67】



【0166】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマ

ーの分子量及び分子量分布を表13に示す。

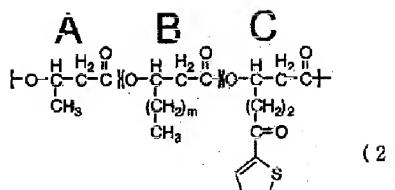
【0167】
【表13】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	820	290	35.4	33000	1.9
含む	815	280	34.4	10000	1.9

【0168】CDW：菌体乾燥重量； PDW：ポリマー乾燥重量； P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量； Mn：数平均分子量； Mw/Mn：分子量分布
(実施例14) 3-ヒドロキシ-5-(2-チエノイル)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御
ポリマー合成基質として5-(2-チエノイル)吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0169】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(29)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=1:37:62(PEGを含まない系)及び1:35:64(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-(2-チエノイル)吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0170】
【化68】



【0171】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表14に示す。

【0172】

【表14】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	870	95	10.9	110000	2.4
含む	875	100	11.4	45000	2.2

【0173】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例15) 3-ヒドロキシ-5-ベンゾイル吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御
ポリマー合成基質として5-ベンゾイル吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0174】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(30)の組成式に示すユニットの割合は、A:B=16:84(PEGを含まない系)及び15:85(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-ベンゾイル吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	660	170	25.8	330000	3.9
含む	665	180	27.1	95000	3.7

【0178】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例16) 3-ヒドロキシ-5-(2-チエニルチオ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

ポリマー合成基質として5-(2-チエニルチオ)吉草酸を用いた以外は実施例11と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

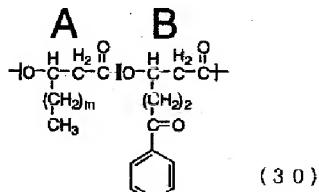
【0179】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(31)に示すポリ3-ヒドロキシ-5-(2-チエニルチオ)吉草酸のほぼホモポリマーであることが示された。

【0180】

【化70】

【0175】

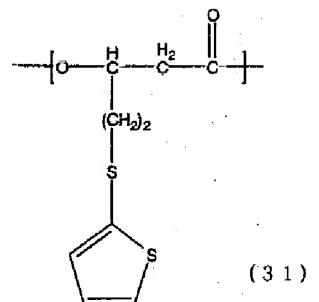
【化69】



【0176】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表15に示す。

【0177】

【表15】



【0181】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表16に示す。

【0182】

【表16】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1100	350	31.8	198000	2.9
含む	1050	350	33.3	74000	2.6

【0183】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

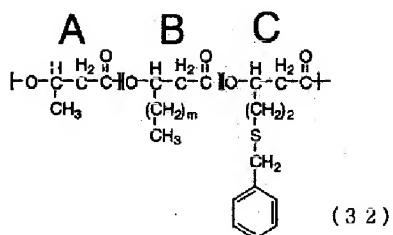
(実施例17) 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

ポリマー合成基質として5-(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0184】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(32)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=2:8:90(PEGを含まない系)及び2:9:89(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0185】

【化71】



PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	980	440	44.9	15000	3.6
含む	990	400	40.4	9000	3.2

【0188】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例18) 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御ポリマー合成基質として5-フェニル吉草酸(0.09%)及び5-(4-ビニルフェニル)吉草酸(0.02%)を用い、クロロホルムによる抽出条件を23.5℃で72時間とした以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0189】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(33)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=1:14:85(PEGを含まない系)及び1:15:84(PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1200	600	50.0	59000	2.0
含む	1150	580	50.4	19000	1.9

【0193】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布
(実施例19) 3-ヒドロキシ-5-(メチルスルファン)フェノキシ]吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御評価を行った。

【0186】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表17に示す。

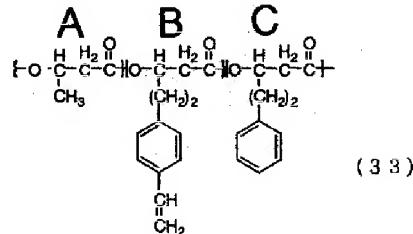
【0187】

【表17】

草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0190】

【化72】



【0191】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表18に示す。

【0192】

【表18】

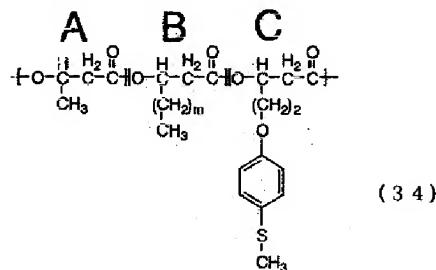
ポリマー合成基質として5-(メチルスルファン)フェノキシ]吉草酸を用いた以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0194】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(34)の組成式

に示すユニットの割合は、A : B : C = 8 : 68 : 24 (PEGを含まない系) 及び 7 : 66 : 27 (PEGを含んだ系) である。3-ヒドロキシ-5-(メチルスルファニル)フェノキシ]吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0195】

【化73】

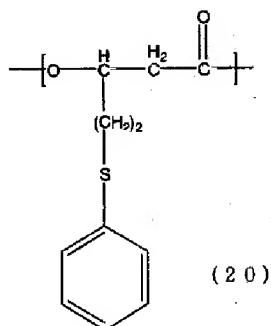


PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	990	150	15.2	16000	2.3
含む	1000	130	13.0	9000	2.1

【0198】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布（実施例20）分子量制御されたポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸のポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル)吉草酸への変換実施例6で得られたポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸のホモポリマーを（以下の式（20））、酸化処理によりポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル)吉草酸に変換した。

【0199】

【化74】

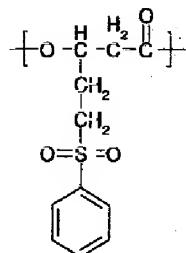


【0200】ポリヒドロキシアルカノエート400mgを100mL容ナスフラスコ中に加え、クロロホルム10mLを加えて溶解した。これを氷浴下に置き、クロロホルム20mLに溶解したメタクロロ過安息香酸138.6mgをゆっくり加えて攪拌した。75分間、氷浴下で攪拌した後、水100mL及び亜硫酸水素ナトリウムを3020mg加えた。その後、クロロホルムにより抽出を行い、ポリマーを回収した。次に、100mLEタノ

【0196】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表19に示す。

【0197】

【表19】



【0203】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られたポリマーの重量、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表20に示す。

【0204】

【表20】

分子量制御剤	重量(mg)	Mn	Mw/Mn
無添加	379	135000	2.0
1,2-BD	366	37000	1.9
1,3-BD	389	35000	2.1
1,6-HD	384	26000	1.9
1,2,3-BT	376	42000	2.1
EG	369	48000	2.0
MEG	382	49000	2.1

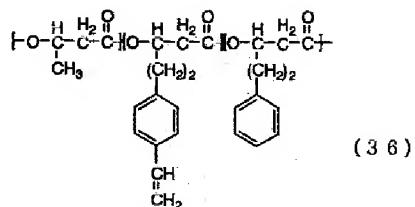
【0205】Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；1, 2-BD：1, 2-ブタンジオール；1, 4-BD：1, 4-ブタンジオール；1, 6-HD：1, 6-ヘキサンジオール、1, 2, 3-BT：1, 2, 3-ブタントリオール；EG：エチレングリコール；MEG：エチレングリコールモノメチルエーテル

(実施例21) 分子量制御された3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット含有PHAの酸化処理による3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)吉草酸ユニット含有PHAへの変換

実施例18で得られた3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA(式(36))の酸化処理による3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)吉草酸ユニット含有PHAへの変換を行った。

【0206】

【化76】



【0207】酸化開裂反応は以下のように行った。窒素雰囲気下、100mLフラスコに3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)アルカン酸ユニットを含むポリエステル0.3g、18-クラウン-6-エーテル0.1923g、ジクロロメタン10.0mLを入れて、攪拌した。フラスコを氷浴につけて、反応系を0℃にした。30分後、過マンガン酸カリウム0.1517gを加え、アルミホイルで反応容器を包み、21時間攪拌した。反応終了後、亜硫酸水素ナトリウムを溶解させた水を加え、その反応溶液をメタノールに再沈殿させることにより、ポリマーを回収した。ここで得られたポリマーを、クロロホルムを用いて透析を行い、精製した。

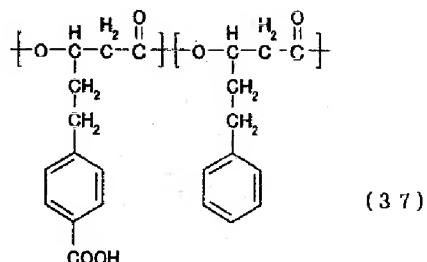
【0208】得られたポリマーの構造決定は、フーリエ変換-赤外吸収(FT-IR)スペクトル(Nicot et al AVATAR 360 FT-IR)により分析を行った。その結果、1693cm⁻¹に新たにカルボン酸

に由来する吸収が見られたことから、得られたPHAは3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)アルカン酸ユニットを有することが判明した。

【0209】また、得られたポリマーとトリメチルシリルジアゾメタンを反応させたものを¹H-NMR(FT-NMR: Bruker DPX 400; ¹H共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: ¹H; 使用溶媒: CDCl₃; reference: キャピラリ封入TMS/CDCl₃; 測定温度: 室温)によって行ったところ、下記式(37)：

【0210】

【化77】



【0211】に示すユニットを含有しているポリヒドロキシアルカノエート共重合体であることが確認された。

【0212】また、得られたポリマーとトリメチルシリルジアゾメタンを反応させたものについて、平均分子量をゲル・パーキエーション・クロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GE L Super HM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した。得られたポリマーの重量、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表21に示す。

【0213】

【表21】

PEG200:1%	重量(mg)	Mn	Mw/Mn
含まない	285	32000	1.9
含む	279	10500	1.7

【0214】Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

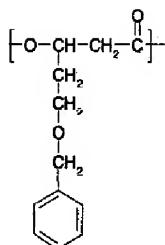
(実施例22) 3-ヒドロキシ-5-[フェニルメチル]オキシ吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

ポリマー合成基質として5-[フェニルメチル]オキシ吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0215】得られたポリマーの構造決定を、¹H-NMRによって行ったところ、以下の式(38)に示す3-ヒドロキシ-5-[メチルスルファニル]フェノキシ吉草酸ユニットのホモポリマーであることが示された。

【0216】

【化78】



【0217】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表22に示す。

【0218】

【表22】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	:P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1350	165	19.2	128000	2.4
含む	1140	125	11.0	52000	2.0

【0219】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

【0220】

【発明の効果】本発明の方法により、側鎖にフェニル構

造、チオフェン構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御が可能となり、また、分子量制御されたポリヒドロキシアルカノエートの提供が可能となつた。

フロントページの続き

(51) Int.C1.7

識別記号

F I

(参考)

C 1 2 R 1:38)

C 1 2 R 1:40

(C 1 2 P 11/00

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 P 17/00

C 1 2 R 1:40)

(72) 発明者 本間 務

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72) 発明者 須川 悅子

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72) 発明者 福井 樹

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72) 発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

F ターム(参考) 4B064 AD32 AD41 AE43 AE61 BH04

BH20 CA02 CC03 CD07 CD08

CD11 CE10 DA01 DA16

4J029 AA02 AB01 AC01 EB01 EC10

ED01 ED03 EE04 EF01 EF02